

ÜBER DAS ÄTHERISCHE ÖL VON GRÜNALGEN

Ein Beitrag zur Taxonomie der Gattung Chlorella

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Reinhard Liersch
aus Gelsenkirchen

1975 № 247

ÜBER DAS ÄTHERISCHE ÖL VON GRÜNALGEN

Ein Beitrag zur Taxonomie der Gattung Chlorococcum

von Dr. phil. med. Adolf F. Schindler

u B Leiden.

an der Universität Leiden

verlegt von

Reinhold Linsch

an der Universität Leiden

ÜBER DAS ÄTHERISCHE ÖL VON GRÜNALGEN

Ein Beitrag zur Taxonomie der Gattung *Chlorella*

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades



vorgelegt von
Reinhard Liersch
aus Gelsenkirchen

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg.

Tag der mündlichen Prüfung:

15. Mai 1975

Vorsitzender der Promotionskommission: Professor Dr. H. Behrens

Erstberichterstatter: Professor Dr. E. Kessler

Zweitberichterstatter: Professor Dr. W. Haupt



Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) Einleitung	2
B) Material und Methoden	4
C) Ergebnisse	8
Dünnschichtchromatographie	8
Gaschromatographische Untersuchungen	9
GC-MS-Untersuchungen	23
D) Diskussion	27
E) Zusammenfassung	30
F) Literatur	32

Abkürzungen

C	Chlorella
DC	Dünnschichtchromatographie
FID	Flammenionisationsdetektor
FGW	Frischgewicht
GC	Gaschromatographie
Lsg.	Lösung
MS	Massenspektrometrie
Rf/hRf	$\frac{\text{Entfernung des Fleckenmittelpunktes vom Start}}{\text{Entfernung der Fließmittelfront vom Start}} \times 100$
Rt (sec)	Retentionszeit in Sekunden
SE-30	Methylsilikongummivorprodukt
TGW	Trockengewicht
Upm	Umdrehungen pro Minute

A) Einleitung

Auf Grund physiologisch - biochemischer Merkmale wurde die Gattung *Chlorella* in 11 Taxa eingeteilt (Kessler, 1967; Kessler et al., 1968; Kessler u. Zweier, 1971; Kessler, 1972b). Durch morphologische Untersuchungen konnten diese Taxa bestätigt werden (Fott u. Nováková, 1969). Unter Hinzuziehung der Ergebnisse von Fott u. Nováková (1969), Kessler (1967) und Shihira u. Krauss (1965) führte die taxometrische Betrachtung der Gattung *Chlorella* (außer *C. fusca* var. *rubescens* Dangeard) zu 10 Taxa (DaSilva u. Gyllenberg, 1972). Durch Untersuchungen des GC - Gehaltes der Kern - DNS konnten diese Taxa durch ein einfaches molekulares Merkmal charakterisiert werden (Hellmann u. Kessler, 1974). Es gibt noch eine Reihe von anderen artspezifischen Merkmalen, wozu insbesondere das Vorkommen verschiedener Sterole bei *Chlorella* zu zählen ist (Patterson, 1971).

Erst vor wenigen Jahren konnten Zolotovitch et al. (1971) nachweisen, daß in Grünalgen der Gattungen *Scenedesmus* und *Chlorella* Verbindungen vorkommen, die man bisher nur in den ätherischen Ölen von höheren Pflanzen (z.B. Kamille) gefunden hatte. Es handelt sich dabei um Prochamazulene (Isaac u. Schimpke, 1965), die der Gruppe der Guajanolide zuzuordnen sind. Diese Bezeichnung rührt daher, daß alle diese Verbindungen Sesquiterpene mit einem Hydroazulengrundgerüst sind. Die Vielfalt der Strukturen und die biologische Bedeutung dieser Gruppe wird von Rücker (1973) ausführlich beschrieben.

Guajan stellt eines der Grundgerüste dar, von denen sich viele Proazulene ableiten lassen. Xanthinin ist ein Sesquiterpenlacton, das in verschiedenen *Xanthium* Arten (z.B. *X. strumarium*, *X. spinosum*, *X. commune*, *X. chinense*, *X. chassei*; Winters et al., 1969) vorkommt. Besonders interessant erscheint diese Verbindung, weil sie als Auxin - Antagonist wirkt.

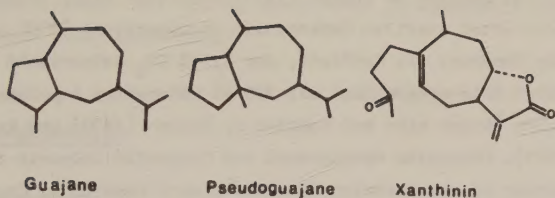


Abb. 1 zeigt einige wenige Vertreter der Proazulene

Neben ihren vielfältigen biologischen Wirkungen (Herout, 1971) sind die obengenannten Verbindungen wertvolle taxonomische Merkmale der Compositae (Herout, 1966; Herz, 1973).

Mit der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, daß einzellige Grünalgen ätherische Öle bilden können, die "per Definitionem" alle wasserdampf-flüchtigen Substanzen umfassen und daß die Untersuchung der Zusammensetzung dieser ätherischen Öle für eine chemotaxonomische Betrachtung der Gattung *Chlorella* von Nutzen ist.

Versuchsobjekte und Kulturbedingungen

Es wurden 88 Stämme von *Chlorella*, die bei Kessler (1967), Kessler et al. (1968) und Kessler u. Zweier (1971) angegeben sind, untersucht. Die Algen wurden unter sterilen Bedingungen im Dauerlicht (4000 Lux) bei 25° C unter Begasung mit Preßluft, der 2,5 % CO₂ beigemischt wurde, in modifizierten Erlenmeyerkolben mit 300 ml Nährmedium angezogen. Die Zusammensetzung findet sich bei Kessler u. Czygan (1970) und Kessler u. Zweier (1971). *Chlorella homosphaera* und *Chlorella vulgaris* f. *tertia* 211-18 wuchsen in der normalen Nährlösung nach Kessler u. Czygan (1970) unter Zusatz von 0,2 % Hefeextrakt (Merck). Die Kulturdauer der Algen betrug etwa 10 Tage.

Einige interessante Algen wurden zwecks Gewinnung größerer Mengen in 8 l oder 16 l Biostaten (Hersteller: B. Braun, Melsungen) steril bei Dauerlicht von 8000 Lux, 25° C und einer Impellergeschwindigkeit von 500 Upm angezogen. Die Begasung der Kulturen erfolgte mit Luft, der 0,5 % CO₂ zugemischt wurde. Weitere Einzelheiten finden sich bei Grimme et al. (1975). Hier betrug die Kulturdauer etwa 7-8 Tage.

Ernte und Aufarbeitung

250 ml der Suspensionen wurden durch Abzentrifugieren in einer Kühltrentrifuge (Wkf) geerntet und 3 mal mit dest. Wasser gewaschen. Bei größeren Volumina wurden die Algen im Durchflußverfahren sedimentiert und wie oben behandelt.

Gewinnung der ätherischen Öle

Bei allen Versuchen wurden die Algen einer Hydrodestillation in einer verbesserten Karlsruher Apparatur nach DAB 7 (BRD) unterworfen. Die Destillationsdauer betrug 2 Stunden. Als Vorlage wurden 0,5 ml n-Hexan

benutzt. Aus Zeitersparnis wurde die Quantität der destillierten Öle, wie vom Arzneibuch vorgeschrieben, nicht volumetrisch, sondern gravimetrisch bestimmt.

Sofern größere Mengen an Algen zur Verfügung standen, wurden sie nach der Hydrodestillation mit 250 ml Petroläther (Siedebereich 40–60° C) je 50 g Algen (FGW) extrahiert.

Untersuchungsmethoden

1) Trockengewicht

Die Bestimmung des TGW erfolgte mit Membranfiltern (Sartorius) nach Soeder et al. (1967).

2) Dünnschichtchromatographie

Es wurden Kieselgel-60 Fertigplatten (Merck) ohne Fluoreszenzindikator verwendet. Als Laufmittel verwendeten wir Benzol/Essigsäure-äthylester (80/20) und Hexan/Chloroform (75/25). Zur Sichtbarmachung der Substanzen wurden die Platten mit Anisaldehyd/Schwefelsäure, Vanillin/Schwefelsäure und p-Dimethylaminobenzaldehyd in Eisessig/Phosphorsäure besprüht (Stahl, 1967).

3) Gaschromatographie

Alle Untersuchungen wurden an Carlo Erba Gaschromatographen mit einem all Glass-System und Flammenionisationsdetektor durchgeführt. Die 2 m langen Trennsäulen waren aus Glas und hatten einen inneren Durchmesser von 3 mm. Als Trägergas benutzten wir nachgereinigten Stickstoff (Linde AG) mit einem Durchfluß von 23 ml/min. Die Brenngase für den FID sind nachgereinigter Wasserstoff und synthetische Luft (beide Linde AG). Als Trennphasen wurden hauptsächlich SE-30, 5 % auf Chromosorb W-AW, 80–100 mesh (Trennzahl 3,6) und Carbowax 20 M, 10 % auf Chromosorb W-AW, 80–100 mesh verwendet (Kaiser, 1967; Ziegler, 1971). Die Injektor- und Detektortemperatur betrug 200° C. Zur Verbesserung der Trennung wählten wir ein lineares Temperaturprogramm von 5° C/min. Die Elektrometerverstärkung und der Schreibervorschub waren wie alle anderen GC-Bedingungen die gleichen.

4) GC/MS-Kopplung

Massenspektrometer 270 (Perkin Elmer), 2m Metallsäule, Carbowax 20 M, 10 % auf Chromosorb W-AW. Trägergas Helium 20 ml/min, Empfindlichkeit Totalionenstrom 100, Elektronenenergie 70 eV, Ionenquelle 150° C. Die übrigen GC-Bedingungen entsprechen den oben genannten.

5) Aufarbeitung der Petroläther-Extrakte

Die konzentrierten Extrakte wurden wie folgt weiter verarbeitet. Zur Entfernung der Fettsäuren wird der Rohextrakt mit 5 % iger Na_2CO_3 Lsg. ausgeschüttelt. Die Phenole verschwinden nach dem Ausschütteln mit 5 % iger KOH Lsg. (Willuhn, 1973). Anschließend wird die organische Phase auf eine Kieselgelsäule aufgetragen. Die präparative Trennung der verschiedenen Verbindungen an Kieselgel wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (Kirchner u. Miller, 1952; Ziegler, 1971; Hefendehl, 1973).

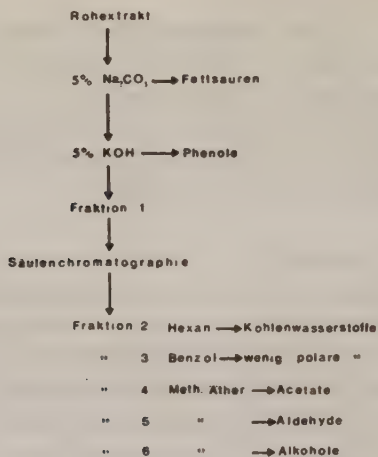


Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung des Trennungsganges

Eine bessere Auftrennung jedoch (s. Abb. 2) liefert die Trockensäulenchromatographie (Kubeczka, 1973). Auch hier werden wie in den eben zitierten Arbeiten zuerst die Kohlenwasserstoffe mit Pentan von der Säule gewaschen. Danach eluiert man mit Benzol die am wenigsten polaren Verbindungen und läßt die Säule trocken laufen. Nun wird die Säule im Verhältnis 4:3:3 eingeteilt und die einzelnen Banden ausgekratzt und mit 10 ml Äther/Methanol ($v/v = 1/9$) erneut eluiert.

Die von Zolotovitch (1971) und Velez (1972) in einzelligen Grünalgen gefundenen sesquiterpenoiden Proazulene sind genuine Bestandteile des ätherischen Öles der verschiedenen Chlorellen. So fanden Sirenko u. Sakevich (1967) im ätherischen Öl von Blaualgen ebenfalls terpenoide Verbindungen. Durch Verbesserung der im DAB 7 beschriebenen Destillationsbedingungen konnten wir die Öle in eingewogene Schraubverschlußgläser überführen und nach der Trocknung wiegen. Auf diese Art konnten auch die im DAB vorgeschriebenen Blindwerte eingespart werden. Die so gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Daraus geht deutlich hervor, daß Qualität und Quantität der ätherischen Öle Art und Stamm abhängig ist. Die Werte liegen zwischen 0,1 und 2 % des Trockengewichtes.

Um sicher zu gehen, daß es sich bei den gefundenen Substanzen weder um Algen- noch um Bakterienexkrete handelt, wurden die geernteten Algen gründlich vom Nährmedium getrennt. Im Übrigen findet man in unseren sterilen Kulturen nach 7-10 Tagen noch keine bakterielle Kontamination.

Die Untersuchungen wurden mit nicht synchronisierten Algen durchgeführt. Für alle 88 Stämme ist es nicht möglich, ohne umfangreiche Vorversuche Synchron-Kulturen anzulegen.

Dünnschichtchromatographie

Die Proazulene wurden wie bei Stahl (1961), Isaac u. Schimpke (1965), Oswiecimska (1974) und Zolotovitch (1971) durch Besprühen der Platten mit EP - Reagenz nach Stahl (1961) und anschließendes 10 minütiges Erhitzen bei 80° C als blaue Flecken sichtbar gemacht (s. Tab. 1). Die Rf - Werte liegen nahezu alle im mittleren Bereich zwischen 30 und 40. Dieser Wert wird auch von Zolotovitch (1971) für einen Scenedesmus- und Chlorellastamm angegeben. Das Vorkommen und die Menge der Proazulene ist wie die Menge des gebildeten Öles je nach Stamm verschieden (s. Tab. 1). Die DC-Analyse zeigt allerdings nur eine Hauptkomponente des ätherischen

Öles von Chlorella. Eine Bestimmung der einzelnen Komponenten ist auf diese Art nicht möglich. Der DC-Nachweis der Proazulene mit EP-Reagenz ist hochspezifisch. Die Angabe der nachgewiesenen Proazulenvorkommen erfolgte nach (+) = Spuren und + = normale Fleckengröße. Naturgemäß besteht zwischen den beiden hier untersuchten Merkmalen ein Zusammenhang. Das "Proazulenvorkommen" ist im Wesentlichen ein qualitatives Merkmal, während die Bildung von "ätherischem Öl" sowohl ein qualitatives als auch ein quantitatives Merkmal darstellt.

Gaschromatographische Untersuchungen

Der Informationsgehalt der Chlorella - Öle ist, bedingt durch die Grenzen der Dünnschichtchromatographie, noch nicht genügend untersucht, um die taxonomisch wichtigen Unterschiede der einzelnen Stämme mit einer hochempfindlichen Methode zu bestätigen. Die Auswahl der Trennflüssigkeiten erfolgte nach Literaturangaben (Harborne, 1973; Ziegler, 1971; Kubeczka, 1971; Herout, 1967).

Die besten Trennungen erhielten wir auf SE-30 als unpolare Phase und Carbowax 20 M als mittelmäßig polare Trennflüssigkeit. Durch die unterschiedliche Selektivität der beiden Säulen werden die einzelnen Öle hinsichtlich ihrer Zusammensetzung grob charakterisiert (Leibnitz u. Struppe, 1970).

Bei einer Reihe von Stämmen findet sich in Tabelle 1 in der Spalte Öl-gewicht ein Minuszeichen. Diese Algen bilden nur so wenig Öl, daß die Menge innerhalb der Fehlergrenze liegt. Diese geringe Menge war jedoch in allen Fällen für ein Dünnschichtchromatogramm und zwei Gaschromatogramme völlig ausreichend. So konnten auch die Öle dieser Algen zur taxonomischen Untersuchung herangezogen werden. Die DC-Ergebnisse werden hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Taxonomie bestätigt.

Tabelle 1 Gehalt an ätherischem Öl und Bildung
von Proazulenen bei Chlorella

Art	Stamm	% Öl d. TGW	Proazulen- vorkommen
C. fusca var. vacuolata Shihira et Krauss	211-8a	0,7	+
	211-8b	1,0	+
	211-8c	0,2	+
	211-8e	0,4	+
	211-8g	1,5	+
	211-8h	0,4	+
	211-11m	1,8	+
	211-11n	0,6	+
	211-15	0,1	+
	C-1.1.10	0,1	(+)
C. fusca var. fusca Shihira et Krauss	343	0,4	-
C. fusca var. rubescens Dangeard, Kessler et al.	232/1	0,3	-
C. homosphaera Skuja	211-8e	0,3	(+)
	Cambridge		
C. zofingiensis Dönnz	211-14a	0,7	+
	211-14b	0,9	+
	211-14c	0,3	+
	C-1.2.1	-	+
C. minutissima Fott et Nováková	C-1.9.1	-	-

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Art	Stamm	% Öl d. TGW	Proazulen- vorkommen
<i>C. saccharophila</i>	211-1b	-	-
(Krüger) Migula	211-1c	-	-
	211-1d	-	-
	211-1f	-	-
	211-9a	-	-
	211-9b	-	-
	211-1a	0,2	+
	C-1,3,1	0,3	+
<i>C. luteoviridis</i>	211-2a	0,1	+
Chodat	211-2b	0,1	+
	211-3	0,2	+
	211-4	0,2	+
	211-5a	0,2	+
	211-5b	0,1	+
<i>C. kessleri</i>	211-11g	0,2	+
Fott et Nováková	211-11h	0,9	+
	397	0,5	+
	398	1,5	+
	C-1,1,1	0,9	+
	C-1,1,12	0,9	+
	C-1,2,2	0,3	+
<i>C. sorokiniana</i>	211-8k	-	(+)
Shihira et Krauss	211-11d	0,1	+
(= <i>C. vulgaris</i> f. <i>tertia</i>	211-11k	-	+
Fott et Nováková)	211-32	0,7	+
	211-33	0,3	-
	211-34	0,5	+

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Art	Stamm	% Öl d. TGW	Proazulen- vorkommen
C. sorokiniana (Fortsetzung)	C-1.1.8	-	+
	C-1.6.7	0,6	-
	Sless 1	-	+
	Sless 2	-	+
	211-31	-	-
	1-9-30	-	-
	211-18	-	-
	Prag A 14	0,5	-
	211-40 a	0,2	-
	211-40 c	-	-
C. vulgaris Beijerinck	211-1e	-	-
	211-8l	0,2	-
	211-8m	0,1	-
	211-11b	-	-
	211-11c	-	-
	211-11f	-	-
	211-11j	-	-
	211-11l	-	-
	211-11p	-	-
	211-11q	-	-
	211-11s	-	-
	211-11t	0,2	-
	211-12	0,2	-
	211-19	-	-
	211-21	-	-
	395	0,1	-
	396	-	-
	211-11r	-	-
	211-30	-	-

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Art	Stamm	% Öl d. TGW	Proazulen- vorkommen
C. protothecoides	211-7a	0,2	+
Krüger	211-7b	-	+
	211-7c	-	+
	211-7d	-	+
	211-8d	-	-
	211-10a	0,4	-
	211-10b	0,2	-
	211-10c	0,9	+
	211-10d	0,4	+
	211-10e	-	+
	211-11a	0,3	+
	211-11i	0,1	+
	211-13	0,5	+
	211-17	0,4	-

Innerhalb der Gattung *Chlorella* war eine Untersuchung der chemotaxonomischen Merkmale auf Grund der schwierigen morphologischen Klassifizierung zwingend notwendig. Die hier untersuchten Merkmale zeigen bei der Mehrzahl der Stämme eine gute Übereinstimmung mit den auf Grund anderer biochemischer Merkmale definierten Taxa (s. Tab. 1).

Wie bereits von Hellmann (1973) festgestellt, gibt es einige Stämme, die nicht in allen bisher untersuchten Merkmalen übereinstimmen. Das abweichende GC - Verhältnis von *C. fusca* 343 und die kleinere Zellgröße (Fott u. Nováková, 1969) sowie das unterschiedliche Verhalten gegenüber verschiedenen Spurenelementen (Shihira u. Krauss, 1965) führten zu einer Abtrennung von *C. fusca* var. *vacuolata* als *C. fusca* var. *fusca*.

In Tabelle 2 sind die GC - Ergebnisse für *C. fusca* zusammengefaßt. Die hier aufgeführten Peaks sind die Hauptkomponenten der einzelnen Öle. Ihre Verteilung bei den einzelnen Stämmen bestätigt die von Kessler (s. Literaturverzeichnis) aufgestellte Einteilung der Stämme. Die Abtrennung von *C. fusca* var. *fusca* 343 von *C. fusca* ist auf Grund der Zusammensetzung ihres Öles nicht unbedingt einleuchtend; eine Reihe anderer Merkmale sprechen aber doch dafür. Auch *C. fusca* var. *rubescens* (Dangeard, 1965; Kessler et al., 1968), deren GC - Verhältnis von *C. fusca* abweichend ist (Hellmann u. Kessler, 1974), liegt mit 0,3 % ätherischem Öl in der Größenordnung von *C. fusca*. Sie ist aber nicht in der Lage, Proazulene zu bilden und somit nicht als *C. fusca* zu betrachten. Ähnliche Ergebnisse findet man bei *C. homosphaera* 211-8e (Cambridge). Der Gehalt an ätherischem Öl liegt auch im *C. fusca* Bereich, während nur sehr wenig Proazulene gebildet werden. Die GC - Untersuchungen der Öle dieser Algen bestätigen ihre Verwandtschaft mit der *C. fusca* - Gruppe.

Säule	Peak-Nr.	1	2	3	4	5	6	7
SE-30	Rt (sec)	1116	1176	1200	1260	1296	1572	2280
Art	Stamm							
C. fusca var. vacuolata Shihira et Krauss	211-8a	+	-	+	+	+	+	-
	211-8b	-	+	+	+	+	+	+
	211-8c	+	+	+	+	+	+	+
	211-8e	-	+	+	+	+	+	+
	211-8g	-	+	-	-	-	+	+
	211-8h	+	-	-	+	+	+	-
	211-11m	-	-	+	+	+	+	+
	211-11n	-	+	-	+	+	+	+
	211-15	-	-	-	+	+	+	+
	C-1.1.10	-	-	-	+	+	+	-
C. fusca var. fusca Shihira et Krauss	343	+	+	+	+	+	+	-
C. fusca var. rubescens Dangeard, Kessler et al.	232/1	+	+	-	-	+	-	+
C. homosphaera Skuja	211-8e	-	-	-	+	+	+	+
	Cambridge							

C. zofingiensis zeigt in allen vier Stämmen einheitliche Gaschromatogramme.

Tabelle 3

Säule	Peak-Nr.	1	2	3	4
SE-30	Rt (sec)	1530	1572	1872	2250

Art	Stamm				
<i>C. zofingiensis</i>	211-14a	+	+	+	+
Dönz	211-14b	+	+	+	+
	211-14c	-	+	+	-
	C-1.2.1	+	+	+	+

Der Stamm C-1.2.1 zeigt im Vergleich zu den anderen Stämmen dieses Taxons einen anderen GC-Gehalt (Hellmann u. Kessler, 1974), ist acidophiler und färbt sich im sauren Medium nicht orange (Kessler, 1967; vergl. auch Kessler u. Czygan, 1970). Obwohl sie Azulene bildet, liegt die Ölmenge deutlich unter der der anderen Stämme.

Bei dem einzigen Stamm von *C. minutissima* läßt sich weder ätherisches Öl noch Proazulen noch sonst irgendein GC-Peak nachweisen.

C. saccharophila 211-1a und C-1.3.1 bilden im Vergleich zu den anderen 6 *C. saccharophila* - Stämmen ätherische Öle und Proazulene. Der Stamm *C. saccharophila* 211-1a wurde wegen der Merkmale keine Hydrogenase, keine Sekundärkarotinoide, aber starke Rutheniumrot - Reaktion Chl. vulgaris zugeordnet (Kessler u. Soeder, 1962; Kessler et al., 1963). Auf Grund der unterschiedlichen Zellform, der positiven Rutheniumrot-Reaktion und der orangen Verfärbung auf Glucose - Agar wurde sie von

C. ellipsoidea abgetrennt (Soeder, 1963). Beide Stämme sind genauso acidophil wie *C. saccharophila* (Kessler, 1967), haben aber im Gegensatz dazu eine Lactat-Gärung (Vinayakumar u. Kessler, 1975) und weisen ein abweichendes GC-Verhältnis auf (Hellmann u. Kessler, 1974). Die GC-Ergebnisse sprechen ebenso wie die DC-Befunde und die oben genannten Ergebnisse für eine Abtrennung von *C. saccharophila*. Eine Zuordnung dieser Stämme zu *C. vulgaris* erscheint auf Grund der vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht sinnvoll.

Tabelle 4 Vergleich der Stämme 211-1a und C-1.3.1 mit *C. saccharophila* (6 Stämme) und *C. vulgaris* (17 Stämme)

Stamm	pH- Grenze	Lactat- Gärung	DNS % GC	% Öl d. TGW	Proazulen- vorkommen
<i>C. saccharophila</i>	2,0	-	50	-	-
211-1a, C-1.3.1	2,0	+	57	0,3	+
<i>C. vulgaris</i>	4,0	+	62	-	-

Fott and Nováková (1969) waren der Ansicht, daß der Stamm 211-1f als *C. saccharophila* var. *ellipsoidea* abgetrennt werden sollte. Dagegen sprechen allerdings das völlige Fehlen von ätherischem Öl und auch von Proazulen bei den restlichen 4 Stämmen dieser Art. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Arbeiten von Kessler (1967) und Hellmann (1973), die diese Abtrennung unwahrscheinlich machen.

C. luteoviridis ist eine in allen untersuchten Merkmalen einheitliche Art. Alle 6 Stämme bilden ätherisches Öl und haben Proazulen. Auch das GC-Muster (s. Tab. 5) ist bei den einzelnen Ölen ähnlich.

Tabelle 5

Säule	Peak-Nr.	1	2	3	4
SE-30	Rt (sec)	1248	1482	1812	2160

Art	Stamm				
<i>C. luteoviridis</i>	211-2a	+	+	+	+
Chodat	211-2b	+	-	+	+
	211-3	-	-	+	+
	211-4	+	+	+	+
	211-5a	-	+	+	+
	211-5b	+	+	+	+

Ebenso zeigen die Öle von *C. kessleri* (Tab. 6) eine ähnliche Zusammensetzung. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen sprechen für ihre Individualität. Alle 7 Stämme dieser Art sind in der Lage, ätherisches Öl und Proazulene zu synthetisieren. Die Ölmenge liegt im Bereich der *C. fusca*-Gruppe.

Tabelle 6

Säule	Peak-Nr.	1	2	3	4	5
Carbowax 20 M	Rt (sec)	1344	1560	1716	1860	2004

Art	Stamm					
<i>C. kessleri</i>	211-11g	+	+	+	+	+
	211-11h	+	-	+	+	-
	397	+	+	+	+	+

Tabelle 6 (Forts.)

Säule	Peak-Nr.	1	2	3	4	5
Carbowax 20 M	Rt (sec)	1344	1560	1716	1860	2004

Art	Stamm
-----	-------

C. Kessleri	398	-	+	+	+	-
(Forts.)	C-1.1.1	+	+	+	+	+
	C-1.1.12	+	-	-	-	-
	C-1.2.2	-	-	-	-	+

Das durch den Besitz von Hydrogenase und die Eigenschaft der Thermophilie (Kessler, 1972b) physiologisch und biochemisch klar von der morphologisch gleichartigen *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* abgegrenzte Taxon *C. sorokiniana* (Shihira et Krauss, 1965), auch als *C. vulgaris* f. *tertia* (Fott u. Nováková, 1969) bezeichnet, weist die größte Schwankungsbreite der hier untersuchten Merkmale auf. Bei 10 von 16 Stämmen konnten wir nur ätherisches Öl, nur Proazulene oder beides finden. Dabei handelt es sich um die Hauptgruppe mit gleichem GC-Gehalt der DNS. Auf Grund des GC-Gehaltes ihrer DNS könnte man die restlichen 6 Stämme in drei weitere Gruppen unterteilen (Hellmann u. Kessler, 1974). 211-31 und 1-9-30 haben weder ätherisches Öl noch Proazulene. Das gleiche gilt für 211-18.

Die Stämme Prag A 14 und 211-40a bilden zwar Öl, haben dabei aber keine Proazulene. Außerdem zeigt Prag A 14 einen für *C. sorokiniana* typischen Peak (Nr. 1). Der Stamm 211-40c hat weder Öl noch Proazulene; aber im Gaschromatogramm findet sich ebenfalls ein *C. sorokiniana* Peak. 211-40a und 211-40c sind Zoochlorellen aus dem Süßwasserschwamm *Spongilla* (Kessler u. Zweier, 1971; Kessler, 1972b). 211-18 und Prag A 14 sind thiaminauxotroph.

Tabelle 7

Säule	Peak-Nr.	1	2	3
SE-30	Rt (sec)	1812	1932	2508

Art	Stamm
-----	-------

C. sorokiniana	211-8k	+	+	+
Shihira et Krauss	211-11d	+	-	-
	211-11k	+	+	+
	211-32	+	+	-
	211-33	+	+	+
	211-34	+	+	+
	C-1.1.8	+	+	+
	C-1.6.7	+	-	-
	Sless 1	+	-	+
	Sless 2	+	+	+
	211-31	+	-	-
	1-9-30	-	-	-
	211-18	-	-	-
	Prag A 14	+	-	-
	211-40a	-	-	-
	211-40c	-	+	-

Alle 19 Stämme von *C. vulgaris* bilden kein Proazulen und nur bei wenigen findet man geringe Mengen ätherisches Öl. Daher zeigen die Gaschromatogramme teilweise keine Peaks (s. Tab. 8).

Säule	Peak-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Carbowax 20 M	Rt (sec)	582	810	1224	1308	1374	1524	1668	1932
Art	Stamm								
C. vulgaris	211-1e	-	-	-	-	-	-	-	-
Bei.jerinck	211-8l	+	-	-	+	+	+	+	-
	211-8m	-	-	-	+	+	+	+	-
	211-11b	-	-	-	-	-	-	-	-
	211-11c	-	-	+	+	+	+	+	+
	211-11f	-	-	+	+	+	+	+	-
	211-11j	-	-	-	-	+	-	-	-
	211-11l	+	-	-	+	+	+	+	+
	211-11p	+	-	+	+	+	+	+	-
	211-11q	-	-	-	-	-	-	-	-
	211-11s	-	+	-	-	-	-	-	-
	211-11t	-	-	-	-	-	-	-	-
	211-12	-	-	+	+	+	+	+	+
	211-19	+	-	+	+	+	+	+	+
	211-21	+	-	+	+	+	+	+	+
	395	+	-	+	+	+	+	+	+
	396	-	-	-	-	-	-	-	-
	211-11r	-	+	-	+	-	-	-	-
	211-30	-	+	-	-	-	-	-	-

Wie zu erwarten war, zeigen die Stämme 211-11r und 211-30 auch bei unseren Merkmalen Abweichungen von den übrigen Stämmen dieser Art. Sie haben einen Peak (Nr. 2) bei 810 sec. Dieser Peak erscheint außerdem noch im Chromatogramm des Stammes 211-11s. Auch die Salzresistenz dieses Stammes ist etwas stärker als bei den anderen Stämmen (Kessler, 1974). 211-11r und 211-30 sind die einzigen Stämme dieses Taxons, die nicht auf Acetat wachsen (Kessler, 1972a) und in normalem Nährmedium nur sehr langsam. Außerdem sind sie wesentlich weniger salzresistent als die übrigen Stämme von *C. vulgaris* (Kessler, 1974). Auch andere Untersuchungen sprechen für eine Abtrennung dieser beiden Stämme von *C. vulgaris* (Hellmann u. Kessler, 1974; Vinayakumar u. Kessler, 1975).

C. protothecoides ist auf Grund aller bisher untersuchten taxonomischen Merkmale als einheitliche Art beschrieben worden. Fünf der 14 Stämme bilden kein ätherisches Öl und drei kein Proazulen. Tab. 9 zeigt das GC-Muster von *C. protothecoides*.

Tabelle 9

Säule	Peak-Nr.	1	2	3	4
SE-30	Rt (sec	1560	1860	1920	2376
Art	Stamm				
<i>C. protothecoides</i> Krüger	211-7a	+	+	+	+
	211-7b	-	-	-	-
	211-7c	+	+	-	+
	211-7d	+	+	+	+
	211-8d	-	+	-	-
	211-10a	+	+	+	-

Tabelle 9 (Forts.)

Säule	Peak-Nr.	1	2	3	4
SE-30	Rt (sec)	1560	1812	1920	2376

Art	Stamm				
C. protothecoides (Forts.)	211-10b	+	+	+	-
	211-10c	+	-	-	-
	211-10d	+	+	+	-
	211-10e	-	+	+	+
	211-11a	-	+	+	+
	211-11i	+	-	+	-
	211-13	-	+	-	+
	211-17	-	+	+	-

Die Art *C. protothecoides* zeigt ein sehr einheitliches GC-Verhältnis (Hellmann, 1973). Lediglich die Stämme 211-11a und 211-11i sind nicht ganz so salzresistent wie die Übrigen. In den von uns untersuchten Merkmalen zeigten die beiden Stämme kein abweichendes Verhalten von den Übrigen Stämmen dieses Taxons.

GC-MS-Untersuchungen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen die Vielfalt der ätherischen Öle der Gattung *Chlorella*. Da eine sichere chemische Identifizierung mit gaschromatographischen Methoden allein nicht möglich ist, wurden die Öle bzw. Extrakte einiger weniger Stämme an einer GC-MS-Kopplung untersucht.

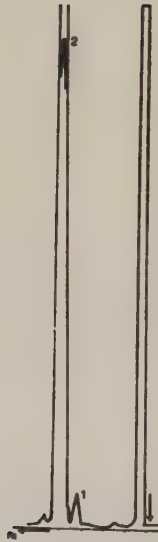


Abb. 3 zeigt das Gaschromatogramm des Öles von *C. homosphaera*,
(Peak 1 = Myrcen, Peak 2 = Limonen).

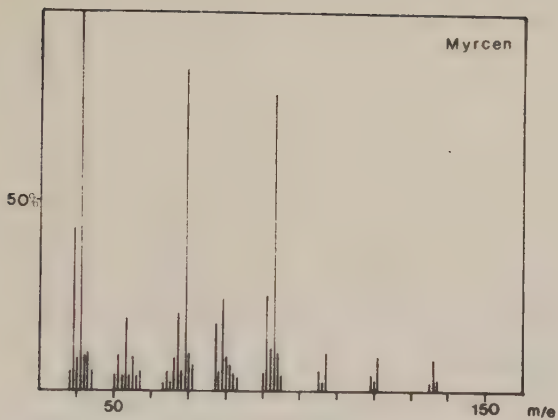


Abb. 4 zeigt das Massenspektrum von Myrcen

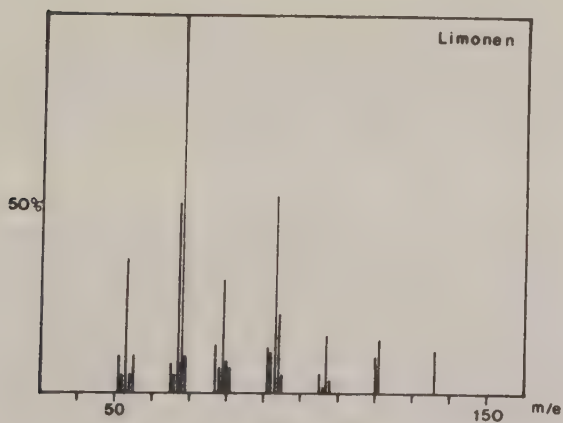


Abb. 5 zeigt das Massenspektrum von Limonen

Für diese Untersuchungen wurden die Algen in 8 l Fermentern (Grimme et al., 1975) kultiviert und nach dem in Abb. 2 dargestellten Trennungsgang aufgearbeitet (Ausnahme: *C. homosphaera*). In Tab. 10 sind die auf diese Art gewonnenen Ergebnisse zusammengefaßt.

Tabelle 10

Art u. Stamm	Fraktion Nr.	Verbindung
<i>C. fusca</i> (Mutante) C-1.1.10.1	3	Eucalyptol p-Cymol
<i>C. sorokiniana</i> 211-Bk	2 3	Limonen Eucalyptol

Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit den Spektren von Standardsubstanzen. Zusätzlich wurden diese noch als interner Standard mit eingespritzt.

Auffällig ist, daß nur Monoterpenalkohole und Monoterpenkohlenwasserstoffe bisher zu identifizieren waren. Die Mutante C-1.1.10.1 des Wildtyps *C. fusca* C-1.1.10 wurde wegen ihres angenehmen Aromas während des Wachstums genauer untersucht. Sie bildet im Vergleich zu ihrem Wildtyp wesentlich mehr ätherisches Öl (9,6 % des TGW). In ihrem Extrakt finden sich in Fraktion 2 neben den erwähnten Monoterpenen auch zwei Sesquiterpenkohlenwasserstoffe mit dem Molekulargewicht 204 und typischen Sesquiterpenfragmenten. Eine genaue Analyse steht zur Zeit noch aus.

Eine taxonomische Einordnung von morphologisch einheitlichen Mikroorganismen ist auf Grund geringer morphologischer Unterschiede sehr schwierig. Fott u. Nováková (1969) gelang eine Identifizierung und Einordnung der Chlorella Stämme unter den oben genannten Gesichtspunkten. Da diese Art Taxonomie nur Spezialisten zugänglich ist, war es notwendig, leichter erfaßbare stoffwechselphysiologische Merkmale als Charakteristika der einzelnen Chlorella Arten einzuführen, zumal einzellige Grünalgen dieser Gattung zu vielen stoffwechselphysiologischen Untersuchungen herangezogen werden. Von Kessler und Mitarbeitern (s. Literaturverzeichnis) wurden eine Reihe von physiologischen und biochemischen Merkmalen mit Erfolg zur taxonomischen Einteilung der Gattung Chlorella herangezogen. Die bisher angewandten physiologischen und biochemischen Merkmale sind bei Kessler (1974) ausführlich beschrieben.

Erste Hinweise von Sirenko u. Sakevich (1967) und Zolotovich et al. (1971) auf das Vorkommen von sekundären Stoffwechselprodukten in Blau-, Grün- und Braunalgen (Fencial et al., 1972) deuteten darauf hin, daß diese Produkte wie bei höheren Pflanzen artspezifisch sind. Dabei handelt es sich um sekundäre Naturstoffe aus aktiviertem Isopren (Luckner, 1969), wie sie in fast allen photoautotrophen Organismen in Form von Carotinoiden und Steroiden vorhanden sind.

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, lassen sich die ätherischen Öle der Chlorellen gut zu einer taxonomischen Betrachtung der Gattung heranziehen. So konnten wir zeigen, daß einige Stämme, deren DNS ein anderes GC-Verhältnis als die übrigen Stämme der Art hat, auch im Merkmal ätherisches Öl abweichend sind. Andererseits sind die GC-Muster ein klares Beispiel für die Individualität der Stämme, die auch durch andere Merkmale bestätigt wird.

Tabelle 11 Vorkommen und Zusammensetzung des ätherischen Öls
von 12 Chlorella Taxa
(+/- = nur bei einigen Stämmen vorkommend).

Art	Proazulen- vorkommen	mittleres Ölgewicht in %	Anzahl der Stämme
C. fusca var. vacuolata	+	0,8	10
C. fusca var. fusca	-	0,4	1
C. fusca var. rubescens	-	0,3	1
C. homosphaera	(+)	0,3	1
C. zofingiensis	+	0,6	4
C. minutissima	-	-	1
C. saccharophila	-	-	6
C. luteoviridis	+	0,2	6
C. kessleri	+	0,7	7
C. sorokiniana (= vulgaris f. tertia)	+/-	0,4	10
C. vulgaris	-	-	17
C. protothecoides	+/-	0,2	14

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse, nach Arten geordnet, zusammengefaßt. Die beiden *C. fusca* Varietäten *C. fusca* var. *fusca* und *C. fusca* var. *rubescens* zeigen nahezu gleiche Ölgewichte und bilden beide kein Proazulen. Die Arten *C. homosphaera*, *C. zofingiensis*, *C. minutissima*, *C. saccharophila*, *C. luteoviridis* und *C. kessleri* werden in ihrer Eigenständigkeit bestätigt.

Eine nahe Verwandtschaft von *C. sorokiniana*, *C. vulgaris* und *C. protothecoides* ist auf Grund des ähnlichen GC-Verhältnisses ihrer DNS, der gleichen Säureresistenz und Lactatgärung naheliegend. Kessler (1974) vermutet, daß *C. vulgaris* sich unter Verlust von Hydrogenase-Aktivität und Thermophilie aus *C. sorokiniana* entwickelt hat. *C. vulgaris* bildet weder ätherisches Öl noch Proazulen. Demgegenüber bilden die Mehrzahl der Stämme von *C. protothecoides* ätherisches Öl und Proazulen. Somit erscheint eine gleichzeitige Entwicklung beider Arten aus *C. sorokiniana* durchaus denkbar.

Wenn man morphologisch schwierig zu beschreibende Organismen mit Hilfe von physiologisch - biochemischen Merkmalen charakterisieren und taxonomisch einordnen will, erhebt sich natürlich die Frage nach der Wertigkeit einzelner Merkmale. Dabei sollte das Hauptaugenmerk auf den Primärstoffwechsel gelegt werden. Die Meinung, daß ätherische Öle immer sekundäre Stoffwechselprodukte sind, die in besonderen Zellen der höheren Pflanzen abgelagert werden, trifft für die Öle von *Chlorella* nicht zu. Die Definition von Luckner (1969) ist für Algen nicht brauchbar.

Wenn man die Algenöle quantitativ mit den Ölen höherer Pflanzen vergleicht, kann man feststellen, daß einige Algenarten, wie z.B. *C. fusca*, *C. kessleri* und *C. zofingiensis*, ähnliche Ölmengen bilden wie höhere Pflanzen. Schilcher (1973) findet bei 19 Ölen, die von Kamillen-

pflanzen unterschiedlicher geographischer Standorte stammen, Ölgehalte zwischen 0,4-1 % des TGW. Auch Bernamottöl wird nur in etwa 0,5 % iger Ausbeute aus *Citrus aurantium* L. subsp. *bergamia* (= *Citrus bergamia* Risso) gewonnen (Merkel, 1972). Die gebildete Ölmenge ist auch bei höheren Pflanzen ein artspezifisches Merkmal.

Eine weitere interessante Tatsache konnte Oswieczimska (1974) bei verschiedenen Arten von *Achillea* beobachten. Es wurde festgestellt, daß das Vorkommen von Proazulenen vom Ploidiegrad der Pflanzen abhängig ist. Nur die tetraploiden Pflanzen bilden (bis auf eine Art) Proazulene. Für *Chlorella* läßt sich bis jetzt noch keine Korrelation zwischen DNS-Gehalt und Proazulen-Vorkommen feststellen.

Sirenko u. Sakevich (1967) stellen eine weitere wichtige Frage: Welche Bedeutung haben die terpenoiden Verbindungen für die Algen oder das Ökosystem, in dem sie normalerweise vorkommen? Dabei spielt die biologische (= z.B. antibakterielle) Funktion der Terpene eine wichtige Rolle.

In diesem Zusammenhang erscheint es mir wichtig, darauf hinzuweisen, daß das Öl von *Evernia prunastri* zur Zeit einer der wichtigsten Rohstoffe der Parfümindustrie ist (Merkel, 1972). Bei Flechtenölen erhebt sich die Frage, von welchem der beiden Symbionten die einzelnen Komponenten stammen. Zolotovich et al. (1971) gingen dieser Frage nach und fanden im Extrakt von *Scenedesmus obliquus* (Pringsheim) Flechtensäuren vom Orcintyp. Eine weitere Untersuchung dieser Probleme könnte neue Informationen über die Wechselbeziehung zwischen Alge und Pilz bei Flechten liefern.

Es konnte gezeigt werden, daß einzellige Grünalgen der Gattung *Chlorella* ätherische Öle bilden. Die in einem Teil der Öle vorkommenden Proazulene haben sich als brauchbares taxonomisches Merkmal erwiesen. Durch gaschromatographische Untersuchungen wurden die GC-Ergebnisse bestätigt.

Die in den vergangenen Jahren erarbeitete Taxonomie von *Chlorella* wurde durch das Merkmal "Bildung von ätherischem Öl und Proazulenen" bestätigt und erweitert.

Bei einigen wenigen Stämmen konnten mit Hilfe von GC-MS Untersuchungen die Monoterpenalkohole Cymol und Eucalyptol sowie die Monoterpenkohlenwasserstoffe Limonen und Myrcen nachgewiesen werden.

Einzelne Arten bilden größenordnungsmäßig ebenso viel ätherisches Öl wie die höheren Pflanzen.

F) Literatur

- Budzikiewicz, M.: Massenspektrometrie, Verlag Chemie, 37-39
Weinheim (1974)
- Czygan, F.C.: Sekundär-Carotinoide in Grünalgen. I. Chemie, Vorkommen
und Faktoren, welche die Bildung dieser Polyene beeinflussen.
Arch. Mikrobiol. 61, 81-102 (1968)
- Dangeard, P.: Sur quelques vertes marines nouvelles observées en
culture. Botaniste, 49, 5-45 (1965)
- DaSilva, E.J., Gyllenberg, H.G.: A taxonomic treatment of the genus
Chlorella by the technique of continuous classification.
Arch. Mikrobiol. 87, 99-117 (1972)
- Deutsches Arzneibuch, 7. Ausgabe (1967)
- Fenical, W., Sims, J.J., Wing, R.M., Radlic, P.C.: Zonarene, a ses-
quiterpene from the brown seaweed Dictyopteris zonaroides.
Phytochem. 11, 1161-1163 (1972)
- Fott, B., Nováková, M.: A monograph of the genus Chlorella. The fresh
water species. In: Studies in Phycology, 10-74. B. Fott,
ed. Prag, Verlag Akad. Wissensch. (1969)
- Grimme, L.H., Kerfin, W., Kersch, D., Kessler, E., Liersch, R.,
Seitz, U.: in Vorbereitung
- Harborne, J.B.: Phytochemical Methods, Verlag Chapman and Hall,
London (1973)
- Hefendehl, F.W.: Beiträge zur Biogenese ätherischer Öle. Zusammen-
setzung des ätherischen Öls von Pelargonium tomentosum.
Planta Medica 22, 378-385 (1972)

Hellmann, V.: Die Basenzusammensetzung der DNS der Grünalge Chlorella
Dissertation, Erlangen (1973)

Hellmann, V., Kessler, E.: Physiologische und biochemische Beiträge
zur Taxonomie der Gattung Chlorella. VIII. Die Basenzusammen-
setzung der DNS. Arch. Microbiol. 95, 311-318 (1974)

Herout, V.: Sesquiterpenische Lactone - ein neues taxonomisches
Merkmal der Compositae.
Planta Medica, 16, (Suppl.), 97-106 (1966)

Herout, V.: Biochemistry of Sesquiterpenoids in "Aspects of terpenoid
chemistry and biochemistry"
{Ed. T.W. Goodwin}, 53-90, Academic Press, London (1971)

Herz, W.: Pseudoguaianolides in Compositae. Nobel 25, Chemistry
in botanical classification, 153-172 (1973)

Isaac, O., Schimpke, H.: Wissenswertes für die pharmazeutische
Praxis. Alte und neue Erkenntnisse der Kamillenforschung.
Mitt. d. dt. pharm. Ges. 35, 133-147 (1965)

Kaiser, R.: Chromatographie in der Gasphase, Bd. III., 2. Auflage,
Bibl. Inst., Mannheim (1969)

Kessler, E.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie
der Gattung Chlorella. III. Merkmale von 8 autotrophen Arten.
Arch. Mikrobiol. 55, 346-357 (1967)

Kessler, E.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie
der Gattung Chlorella. VI. Verwertung organischer Kohlenstoff-
verbindungen. Arch. Mikrobiol. 85, 153-158 (1972a)

Kessler, E.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie
der Gattung Chlorella. VII. Die Thermophilie von Chlorella
vulgaris f. tertia Fott et Nováková.
Arch. Mikrobiol. 87, 243-248 (1972b)

- Kessler, E.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella*. IX. Salzresistenz als taxonomisches Merkmal. Arch. Microbiol. 100, 51-56 (1974)
- Kessler, E.: Biochemical and physiological characters in the taxonomy of the genus *Chlorella*. Symposium on taxonomy of algae, Madras (1974) in press.
- Kessler, E., Czygan, F.C.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella*. IV. Verwertung organischer Stickstoffverbindungen. Arch. Mikrobiol. 70, 211-216 (1970)
- Kessler, E., Czygan, F.C., Fott, B., Nováková, M.: Über *Halochlorella rubescens* Dangeard. Arch. Protistenk. 110, 462-467 (1968)
- Kessler, E., Langner, W., Ludewig, J., Wiechmann, H.: Bildung von Sekundär-Carotinoiden bei Stickstoffmangel und Hydrogenase-aktivität als taxonomische Merkmale in der Gattung *Chlorella*. In: Studies on microalgae and photosynthetic bacteria, 7-20. Tokyo: Japanese Society of Plant Physiologists (1963)
- Kessler, E., Soeder, C.J.: Biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*. Nature 194, 1096-1097 (1962)
- Kessler, E., Zweier, I.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella*. V. Die auxotrophen und mesotrophen Arten. Arch. Mikrobiol. 79, 44-48 (1971)
- Kirchner, J.G., Miller, J.M.: Preparation of terpenless essential oils. A chromatographic process. Industrial and Engineering Chemistry 44, 318-321 (1952)
- Kubeczka, K.H.: Vortrennung ätherischer Öle und ähnlich komplexer Stoffgemische für die GC-Analyse durch modifizierte Trockensäulen-Chromatographie. Chromatographia 6, 106-107 (1973)
- Leibnitz, E., Struppe, H.G.: Handbuch der Gaschromatographie, 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim (1970)

- Luckner, M.: Der Sekundärstoffwechsel in Pflanze und Tier,
G. Fischer Verlag, Stuttgart (1969)
- Merkel, D.: Riechstoffe, Akademie Verlag, Berlin (1972)
- Oswiecimska, M.: Korrelation zwischen Chromosomenzahl und Procham-
azulenen in *Achillea* von Osteuropa.
Planta Medica 25, 389-395 (1974)
- Patterson, G.W.: The distribution of sterols in algae.
Lipids 6, 120-127 (1971)
- Rücker, G.: Sesquiterpene. *Angew. Chem.* 85, 895-907 (1973)
- Schilcher, H.: Neuere Erkenntnisse bei der Qualitätsbeurteilung von
Kamillenblüten bzw. Kamillenöl. Teil 2: Qualitative Beurtei-
lung der Handelskamillen in vier bzw. fünf chemische Typen.
Planta Medica 23, 132-144 (1973)
- Shihira, J., Krauss, R.W.: *Chlorella*. Physiology and taxonomy of
forty-one isolates. College Park, Maryland: University of
Maryland (1965)
- Sirenko, L.A., Sakevich, A.J.: Die Bildung von Terpenen bei Blaualgen
(aus dem Russischen übersetzt).
Doklady Akad. Nauk. SSSR 177, 959-960 (1967)
- Soeder, C.J.: Weitere zellmorphologische und physiologische Merkmale
von *Chlorella*-Arten. In: *Studies in microalgae and photosynthe-
tic bacteria*, 21-34. Tokyo: Japanese Society of Plant Physiolo-
gists (1963)
- Soeder, C.J., Schulze, G., Thiele, D.: Einfluß verschiedener Kultur-
bedingungen auf das Wachstum in Synchronkulturen von *Chlorella*
fusca Shihira et Krauss.
Arch. Hydrobiol., Suppl. 33, (Falkau-Arbeiten 6), 127-171 (1967)
- Stahl, E.: (Hersc.) *Dünnschichtchromatographie* 2. Auflage, 203-253,
Springer Verlag Berlin (1967)

- Velev, T.K.: Isolierung, Trennung und Identifizierung der aus Grünalgen gewonnenen Konkrete. Dissertation, Sofia (1973)
- Vinayakumar, M., Kessler, E.: Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*. X. Products of glucose fermentation. *Arch Microbiol.* 103, 13-19 (1975)
- Willuhn, G.: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. VI. Charakterisierung und präparative Auftrennung der ätherischen Öle aus den Wurzeln, Rhizomen, Blättern und Blütenkörbchen verschiedener Arnica-Arten. *Planta Medica* 21, 329-342 (1972)
- Winters, T.E., Geissmann, T.A., Safir, D.: Sesquiterpene lactones of *Xanthium* species, Xanthanol and Isoxanthanol, and correlation of Xanthinin with Ivalbin. *J. Org. Chem.* 34, 153 (1969)
- Ziegler, E.: Zur Beurteilung von Citrusölen. *Dt. Lebensmittelrundschau* 66, 290-296 (1970)
- Zolotovitch, G., Velev, T., Michailova, S., Dilov, Hr.: Duftstoffe in kultivierten Microalgen. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Agricoles en Bulgarie*, 4, 445-455 (1971)

Herrn Prof. Dr. E. Kessler danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und stete Unterstützung.

Für sorgfältige und zuverlässige technische Assistenz danke ich besonders Frl. Gudrun Schneider und Frau Doris Liersch.

Den Herren H. Brandauer und E. Ziegler (Fa. Aromachemie, Aufseß) danke ich für die Aufnahme der Massenspektren und Unterstützung bei der Auswertung.

Dem Bundesminister für Forschung und Technologie bin ich für die Unterstützung mit Personal- und Sachmitteln zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Reinhard Liersch

28.11.1946	in Gelsenkirchen als Sohn des Maschinensteigers Erich Liersch und seiner Ehefrau Ilse, geb. Prymus, geboren
1953-1957	Besuch der Grundschule in Marl
1957-1967	Besuch des Gymnasiums in Marl und Langenod
1.7.1967	Abitur am Nordsee-Gymnasium in Langenod
WS 67/68 bis WS 69/70	Biologiestudium in Münster/Westf.
16.10.1969	Dipl. - Vorprüfung in Münster
SS 70 bis SS 72	Studium in Erlangen
5.6.1972	Diplomhauptprüfung in Erlangen
seit 1.10.1972	wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Botanik und pharmazeutische Biologie

Bamberger Fotodruck *Schadel & Wehle*
GmbH & Co. KG.
86 Bamberg · Hohe-Kreuz-Sti. 9b · Telefon: 0951/21617